

Розроблення ефективної методики індукції калюсогенезу зі зрілих зародків *Triticum spelta* L. та *T. aestivum* L.

А. В. Кирієнко^{1,2*}, М. Ф. Парій², М. В. Кучук¹, Ю. В. Симоненко^{1,2}, Н. Л. Щербак¹

¹Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, вул. Академіка Заболотного, 1486, м. Київ, 03143, Україна, *e-mail: anastasija.kirienko@gmail.com

²Всеукраїнський науковий інститут селекції, вул. Васильківська, 30, м. Київ, 03022, Україна

Мета. Введення в культуру *in vitro* та одержання калюсів із зрілих зародків з зразків пшениці спельти та порівняння ефективності їхнього калюсогенезу із 2 зразками пшениці м'якої. **Методи.** Для проведення цього дослідження було обрано 5 зразків гексаплоїдної пшениці: 3 – спельти та 2 – пшениці м'якої. Стерилізацію зерна проводили 96% етиловим спиртом та 5% розчином гіпохлориту натрію. Для уведення в культуру *in vitro* експлантами брали зрілі зародки. Для калюсогенезу використали три типи живильних середовищ Мурасіге і Скуга (MS) з різним компонентним складом. Експланти культивували в темряві 21 добу. **Результати.** Підібрано оптимальні умови для індукції культури тканин *Triticum spelta* L. та *T. aestivum* L. із зрілих зародків. Отримані з різних зразків калюси, які вирощували на трьох типах модифікованого живильного середовища MS, не відрізнялись між собою морфологічно. У сортів спельти 'Європа' і пшениці м'якої 'Бунчук' та 'Елегія Миронівська' незалежно від складу середовища спостерігали високу ефективність калюсоутворення, у той час як на експлантах спельти сорту 'Зоря України' відбувалось повільне формування калюсу. **Висновки.** З експлантів зрілих зародків отримано культуру тканин з зразків спельти та 2 зразків пшениці м'якої. Встановлено, що найефективнішими для калюсоутворення з експлантів зрілих зародків пшениці м'якої та спельти було живильне середовище MS з 3% сахарози, доповнене 2 мг/л 2,4-Д, 10 мл/л аргентумом нітрату. Ефективність калюсогенезу на 21 добу культивування, залежно від зразка, варіювала в межах 80,2–100,0%. Досліджувані зразки відрізнялись між собою за здатністю формувати калюси на живильних середовищах із різним компонентним складом.

Ключові слова: спельта; пшениця м'яка; культура *in vitro*; калюс; експланти.

Вступ

Пшениця м'яка (*Triticum aestivum* L.) та спельта (*T. spelta* L.) – важливі промислові культури. Відомо, що на сьогоднішній день у світі посівні площі пшениці м'якої займають близько 220 мільйонів гектарів і щорічно світовий врожай зерна складає близько 749 мільйонів тонн [1]. Водночас спельта, на противагу пшениці м'якій, займає вузьку

нішу, і часто має попит на ринку екологічно чистої органічної продукції. З огляду на господарське поширення пшениці м'якої та попит на органічну продукцію перспективним є створення нових сортів пшениці м'якої та спельти, що будуть нести покращені господарсько-цінні ознаки такі, як підвищена врожайність, стійкість до вилягання, резистентність до біотичних та абіотичних стресів. Класична генетика не встигає задовольнити сучасні потреби зі створення нового перспективного рослинного матеріалу, тому для вирішення цієї проблеми доцільно використовувати біотехнологічні та генно-інженерні підходи. Актуальним є одержання культури тканин *in vitro* вихідного зразка, здійснення її генетичної трансформації на предмет перенесення генів господарсько-цінних ознак та створення рослинного матеріалу з покращеними властивостями. Тому першим етапом цієї роботи є

Anastasiia Kyriienko

<https://orcid.org/0000-0002-8117-5288>

Myroslav Parii

<https://orcid.org/0000-0001-9877-2241>

Nikolay Kuchuk

<https://orcid.org/0000-0001-7365-7474>

Natalia Shcherbak

<https://orcid.org/0000-0002-2478-8408>

Yuri Symonenko

<https://orcid.org/0000-0002-5597-3315>

введення вихідного робочого зразка в культуру *in vitro*.

Відомо, що регенерація рослин *in vitro* буває як прямою, так і непрямою. Для прямого типу регенерації *in vitro* важливою є стадія формування калюсу. У подальшому з калюсу відбудеться регенерація рослини шляхом органогенезу або соматичного ембріогенезу. Для злакових культур досить характерною є непряма регенерація. Тому дуже важливим та необхідним етапом у розробці системи ефективної регенерації спелти є формування органогенного калюсу. З огляду на це, досліджувалась ефективність стадії калюсогенезу для одержання калюсу спелти.

На сьогодні практично відсутні дані щодо ефективності калюсогенезу у спелти, оскільки вона є менш дослідженою ніж пшениця м'яка, для якої відомо багато підходів для одержання калюсів. Уведення в культуру *in vitro* варто починати із підбору типу експланту. Найчастіше в ролі експлантів для пшениці м'якої використовують апікальні меристеми молодих проростків [2], незрілі зародки [3] та зрілі зародки [4].

Для індукції утворення калюсу можна використовувати співвідношення ростових факторів, штучних ауксинів та цитокінінів, в якому більше ауксинів, а саме 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти (2,4-Д) [3, 5], пиклораму, 1-нафтилоцтової кислоти (НОК), тидіазурону (ТДЗ), індол-3-оцтової кислоти (ІОК) тощо і менше (або взагалі відсутні) цитокініни – кінетин [3], 6-бензиламінопурин (БАП) тощо. Для того, щоб знизити ризик контамінації культури тканин різними мікроорганізмами, окрім антибіотиків та фунгіцидів, можна також використовувати аргентум нітрат [6].

Відомо, що для отримання калюсів із зрілих зародків можна використовувати базове середовище MS. А після трьох тижнів культивування переносити на середовище MS із 2 мг/л 2,4-Д [7]. Для формування калюсу із листових експлантів використовують поєднання 2,4-Д у концентрації 2 мг/л та аргентуму нітрату в концентрації 10 мг/л [8]. Поєднання 2,4-Д (1,5 мг/л) та кінетину (0,5 мг/л) використовують для одержання калюсної культури із пиляків пшениці на живильному середовищі C-17 [9]. Штучний ауксин 2,4-Д у концентрації 2 мг/л у складі базового середовища MS може використовуватись для індукції калюсу із пшениці м'якої [4, 10] та твердої [11]. Живильне середовище на основі MS, яке містить 2,5% сахарози та половину солей MS (1/2 MS середовища), але

має у своєму складі 2 мг/л 2,4-Д, викликає утворення калюсів у пшениці м'якої вже через два тижні культивування [12]. Збільшення концентрації 2,4-Д до 3,0–3,5 мг/л позитивно впливає на формування калюсів із експлантів зрілих зернівок [13]. Використання 2,4-Д в концентрації 1 мг/л без застосування інших регуляторів росту призводить до утворення компактних калюсів, але підвищує ризогенез, та в подальшому негативно впливає на якість утворених ембріодів. Для формування ембріогенного калюсу найбільш оптимальною концентрацією 2,4-Д є 2 мг/л [14]. У своїй роботі Baday S. J. S. [15] зазначає, що для індукції калюсогенезу із експлантів зрілих зародків найоптимальнішими концентраціями 2,4-Д та кінетину в базовому середовищі MS є 2,5 та 0,9 мг/л відповідно. Також відомо, що у пшениці твердої для експлантів незрілих зародків аргентум нітрат у концентрації до 10 мг/л сприяє утворенню соматичних ембріодів [16].

Мета досліджень – введення в культуру *in vitro* експлантів зрілих зародків, одержання калюсів з зразків спелти та порівняння ефективності їх калюсогенезу із 2 зразками пшениці м'якої.

Матеріали та методика досліджень

Для дослідження було обрано 5 зразків гексаплоїдної пшениці: пшениця м'яка яра – *Triticum aestivum* L. сорт 'Елегія Миронівська' (зразок № 1), озима – *T. aestivum* L. сорт 'Бунчук' (№ 2), озима спелта – *T. spelta* L. сорти 'Альберта' (№ 3), 'Європа' (№ 4) та 'Зоря України' (№ 5). Нами були обрані саме ці зразки, оскільки сорти 'Бунчук' та 'Елегія Миронівська' є національними стандартами для пшениці м'якої, сорт 'Зоря України' – для спелти. Два інші зразки спелти – сорти 'Європа' та 'Альберта' були узяті для порівняння отриманих даних по спелті. Зразки насіння були отримані з колекції ТОВ «Всеукраїнський науковий інститут селекції».

Для введення в культуру *in vitro* експлантами обрали зрілі зародки, які відокремлювали від зерна. Попередньо здійснили поверхневу стерилізацію зерна у 96% етилового спирті – 5 хв, 5% гіпохлориті натрію – 10 хв, тричі відмивали у стерильній дистильованій воді. Для легшого відокремлення зрілих зародків від зернівки виконували попереднє замочування зерна у стерильній дистильованій воді протягом 2 годин.

Для індукції калюсогенезу використовували три типи модифікованого живильного

середовища Мурасіге і Скуга (MS) [17]: MS № 1, доповнене 1 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л пикло-раму, 150 мг/л цефтриаксону, 3% сахарози; MS № 2, доповнене 2 мг/л 2,4-Д, 10 мг/л AgNO₃, 150 мг/л цефтриаксону, 3% сахарози; MS № 3, доповнене 2 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л кінетину, 150 мг/л цефтриаксону, 2% сахара-рози, вітамінами за живильним середови-щем [18].

Експланти рівномірно (по 45–55 штук) розміщували на чашках Петрі із відповід-ним живильним середовищем і культивува-ли в темряві при 25 °С протягом 21 доби. Було використано 5 повторів для кожного зразка та типу живильного середовища. Оцінку інтенсивності та характеру калюсо-генезу здійснювали кожні 7 днів. При цьому враховували розмір калюсів, їх структуру, колір, частоту утворення та характер росту.

Ефективність калюсоутворення визнача-ли за формулою $(K / E) \times 100$, де, K – кіль-кість експлантів, на яких утворювався ка-люс, E – загальна кількість висаджених екс-плантів [19].

Результати та обговорення

Для введення в культуру *in vitro* викорис-товували зрілі зародки спельти та пшениці м'якої, які культивували на трьох типах живильних середовищ для індукції калюсо-генезу. Нами отримано культуру *in vitro* тканин спельти сортів 'Альберта', 'Європа', 'Зоря України' та пшениці м'якої сортів 'Бунчук' та 'Елегія Миронівська'. Узагал-нені результати з ефективності калюсоутво-рення подані у таблиці 1.

Таблиця 1

Ефективність калюсоутворення із зрілих зародків 3 зразків спельти та 2 зразків пшениці м'якої на 21 добу росту на живильних середовищах різного компонентного складу

Сорт	Ефективність калюсогенезу (%), $x \pm S$		
	Середовище MS № 1	Середовище MS № 2	Середовище MS № 3
'Елегія Миронівська'	95,0 ± 7,0	99,2 ± 1,7	91,6 ± 10,5
'Бунчук'	96,6 ± 4,9	98,4 ± 3,5	94,8 ± 4,8
'Альберта'	86,4 ± 8,6	86,2 ± 7,8	76,0 ± 17,1
'Європа'	97,8 ± 4,9	100,0 ± 0,0	98,0 ± 4,4
'Зоря України'	72,0 ± 16,3	80,2 ± 19,7	64,0 ± 15,3

Примітка. x – середнє значення, S – похибка вибіркової середньої.

Показано, що досліджувані зразки відрі-зняються за здатністю утворювати калюс. Найвищий відсоток калюсогенезу був при використанні живильного середовища MS № 2. Він варіював у межах 80,2–100,0% на

21 добу росту для різних зразків (табл. 2). Так, на 7 добу культивування відсоток ефек-тивності калюсогенезу був не менше 59,8%, а на 21 добу – вже перевищував 80,2%. На цьому живильному середовищі найбільш ефективне калюсоутворення виявлено для зразку спельти сорту 'Європа' на 21 добу росту – 100% (табл. 2). Найнижчою ефек-тивність калюсоутворення була у зразка спельти сорту 'Зоря України'. На 7 добу ка-люсогенезу вона склала 59,8%, а на 21 добу – 80,2% (табл. 2). Зразки пшениці м'якої сортів 'Бунчук', 'Елегія Миронівська' та спельти 'Альберта' показали середні зна-чення ефективності калюсогенезу щодо ви-щеописаних. На 7 добу росту на живильно-му середовищі MS № 2 ці зразки демонстру-вали такі результати: 90,2; 95,0 та 75,0% відповідно (табл. 2). На 21 добу культиву-вання середня ефективність калюсогенезу зросла до 99,2; 98,4 та 86,2% відповідно (табл. 2). Виходячи з отриманих результатів можна припустити, що 2,4-Д в концентрації біля 2 мг/л та аргентум нітрат у середній концентрації (біля 10 мг/л) мають позитив-ний вплив на ефективність калюсогенезу.

Автори Hussein K. Zair Al-Kaaby et al. [6] зазначають, що аргентум нітрат відіграє певну роль у формуванні ембріогенного ка-люсу. Високі концентрації (понад 10 мг/л) цього агенту здатні викликати інгібування утворення калюсу так само, як і низькі (менше 5 мг/л). Аргентум нітрат у концен-трації 5–10 мг/л чинить позитивний вплив на утворення ембріогенного калюсу [6].

Встановлено, що додавання в живильне середовище 2 мг/л 2,4-Д веде до утворення калюсу із зрілих зародків у діапазоні 97,6–100,0% залежно від зразка [20].

Таблиця 2

Динаміка калюсоутворення 3 зразків спельти та 2 зразків пшениці м'якої на живильному середовищі MS № 2 протягом 21 доби росту

Сорт	Ефективність калюсогенезу (%), $x \pm S$		
	7 доба	14 доба	21 доба
'Елегія Миронівська'	90,2 ± 10,1	92,8 ± 5,0	99,2 ± 1,7
'Бунчук'	95,0 ± 4,5	98,4 ± 3,5	98,4 ± 3,5
'Альберта'	75,0 ± 11,7	77,8 ± 10,6	86,2 ± 7,8
'Європа'	95,0 ± 5,0	97,2 ± 4,7	100,0 ± 0,0
'Зоря України'	59,8 ± 13,4	68,6 ± 14,3	80,2 ± 19,7

Примітка. x – середнє значення, S – похибка вибіркової середньої.

Іншим живильним середовищем, придат-ним для отримання калюсів, стало MS № 1 (табл. 3). На 7 добу середні значення ефек-тивності калюсоутворення варіювали в межах 64,2–96,6%; а на 21 добу культиву-

вання – 72,0–97,8% (табл. 3). Подібно до середовища MS № 2, на живильному середовищі MS № 1 калюси найбільш ефективно утворював зразок спельти сорту ‘Європа’ – на 21 добу середнє значення калюсогенезу було 97,8% (табл. 1), що є трохи нижчим показником, ніж при культивуванні на MS № 2 (100%) (табл. 1). Спельта ‘Зоря України’ знову демонструвала найнижчу ефективність калюсогенезу – 72,0% на 21 добу культивування (табл. 3), що було навіть менше, ніж у випадку із живильним середовищем MS № 2 (80,2%) (табл. 1).

Таблиця 3

Динаміка ефективності калюсоутворення 3 зразків спельти та 2 зразків пшениці м’якої на живильному середовищі MS № 1 протягом 21 доби культивування

Сорт	Ефективність калюсогенезу (%), $x \pm S$		
	7 доба	14 доба	21 доба
‘Елегія			
Миронівська’	78,6 ± 26,2	95,0 ± 7,0	95,0 ± 7,0
‘Бунчук’	96,6 ± 4,9	96,6 ± 4,9	96,6 ± 4,9
‘Альберта’	74,4 ± 13,1	82,6 ± 3,9	86,4 ± 8,6
‘Європа’	92,8 ± 6,3	94,0 ± 7,1	97,8 ± 4,9
‘Зоря України’	64,2 ± 17,9	67,6 ± 12,5	72,0 ± 16,3

Примітка. x – середнє значення, S – похибка вибіркової середньої.

Parmar et al. [21] зазначають, що пиклорам у концентраціях 2 мг/л та 4 мг/л викликає 100% індукцію калюсоутворення. Пиклорам у концентрації, вищій 4 мг/л, підвищує відсоток регенерації (68,0% проти 63,0%).

Серед трьох досліджуваних живильних середовищ найменш ефективним для калюсоутворення було MS № 3. На 7 добу культивування ефективність калюсогенезу варіювала в межах 47,2–91,0%, а на 21 добу – 64,0–98,0%. Загалом, зразки сортів спельти ‘Європа’ та ‘Зоря України’ виявили здатність формувати калюс на живильних середовищах із різним компонентним складом. Зразок спельти ‘Європа’ показав найвищу ефективність калюсоутворення – 98,0% на 21 добу. Спельта ‘Зоря України’ найменш ефективно утворювала калюси – 64,0% на 21 добу (табл. 4). Можна припустити, що здатність утворювати калюс для зразків сортів спельти ‘Європа’ та ‘Зоря України’ є генетично детермінованою ознакою, яка буде проявлятися однаковою мірою на різних живильних середовищах за різних умов культивування.

Відомо, що незначні концентрації кінетину (1 мг/л) здатні позитивно впливати на утворення калюсу в гексаплоїдній пшениці [3]. Однак, у нашому дослідженні живиль-

не середовище MS із вмістом цього регулятора росту в концентрації 0,5 мг/л демонструвало найнижчий відсоток ефективності калюсогенезу – 47,2%, у той час, як для MS № 1 – 72,0% та MS № 2 – 80,2% на 21 добу. Для індукції калюсоутворення із експлантів незрілих зародків також використовують базове середовище MS, доповнене гідролізатом казеїну (300 мг/л), L-глутаміном (500 мг/л), L-проліном (500 мг/л), що у якості регуляторів росту містить 2 мг/л 2,4-Д та 0,5 мг/л кінетину. Якщо в це живильне середовище додати аргентум нітрат у концентрації 2–10 мг/л, то це позитивно сприяє калюсоутворенню (частота калюсоутворення 81,7–95,0%) та зменшує некроз (частота некрозу калюсів 11,7–1,7%) залежно від зразка [22]. Дуже часто для індукції калюсоутворення із експлантів зрілих зародків пшениці використовують живильне середовище, що містить саме 2 мг/л 2,4-Д без додаткових ауксинів та цитокінінів [4].

Таблиця 4

Динаміка ефективності калюсоутворення 3 зразків спельти та 2 зразків пшениці м’якої на живильному середовищі MS № 3 протягом 21 доби

Сорт	Ефективність калюсогенезу (%), $x \pm S$		
	7 доба	14 доба	21 доба
‘Елегія			
Миронівська’	85,0 ± 7,4	85,0 ± 7,4	91,6 ± 10,5
‘Бунчук’	89,8 ± 8,0	92,0 ± 5,1	94,8 ± 4,8
‘Альберта’	65,2 ± 24,1	66,2 ± 23,3	76,0 ± 17,1
‘Європа’	91,0 ± 15,1	98,0 ± 4,4	98,0 ± 4,4
‘Зоря України’	47,2 ± 20,1	49,2 ± 22,2	64,0 ± 15,3

Примітка. x – середнє значення, S – похибка вибіркової середньої.

Загалом калюси різних зразків та ті, що утворювались на різних живильних середовищах, не відрізнялись між собою морфологічно. Калюси спельти ‘Європа’ та пшениці м’якої ‘Бунчук’ представлені на рисунках 1 та 2 відповідно. До 14 доби росту на живильному середовищі калюси мали рихлу структуру, були білого, іноді світло-жовтого кольору. Розміри калюсів здебільшого коливались в межах від 3 до 8 мм, для більшості зразків (крім зразка спельти сорту ‘Зоря України’) після 7 доби росту вони становили 3–4 мм, а ближче до 21 доби спостережень сягали 6–8 мм.

У ході дослідження було помічено, що деякі зразки спельти та пшениці м’якої можуть однаково ефективно або неефективно, утворювати калюси, що не залежить від того, на якому живильному середовищі вони ростуть.

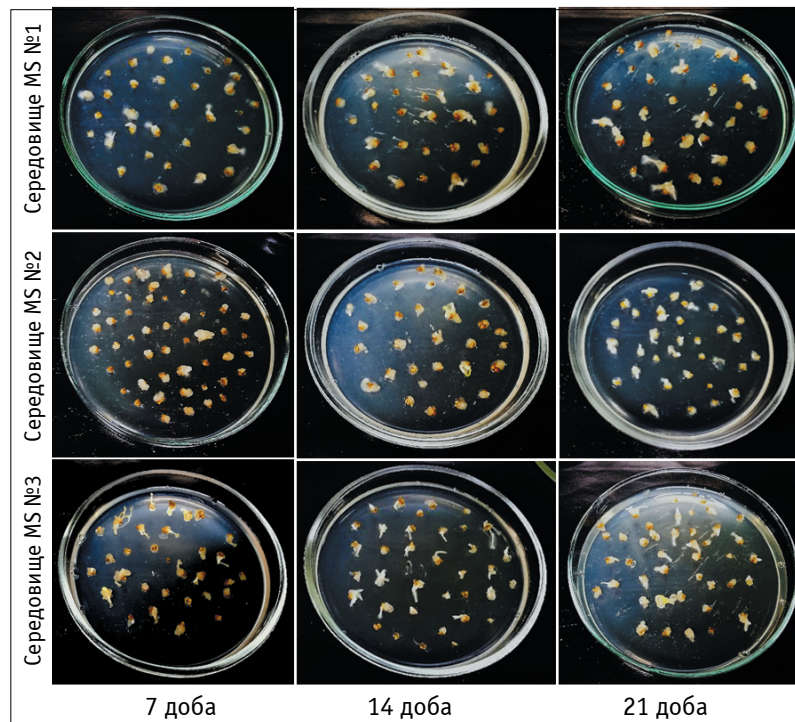


Рис. 1. Утворення та динаміка росту калюсів зразка *T. spelta* L. 'Європа' на різних типах живильного середовища

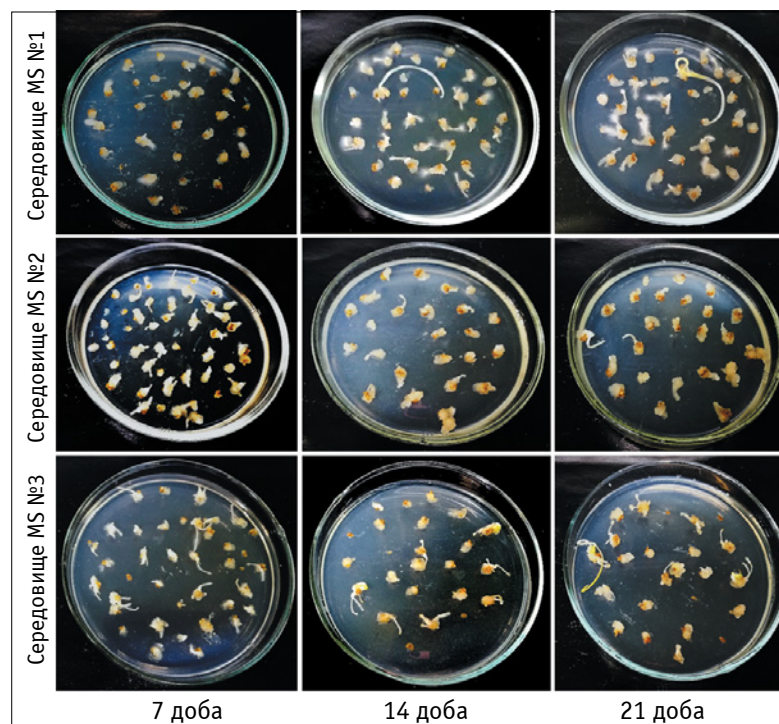


Рис. 2. Утворення та динаміка росту калюсів зразка *T. aestivum* L. 'Бунчук' на різних типах живильного середовища

Досліджувані зразки відрізнялись між собою за швидкістю утворення калюсів та їхнім ростом. Швидкість калюсогенезу можна оцінити за ефективністю калюсоутворення на 7 добу культивування. Зокрема, найшвидше та найкраще росли калюси від зразків

спельти сорту 'Європа' – 92,8% (MS № 1), 95,0% (MS № 2), 91,0% (MS № 3) та пшениці м'якої сорту 'Бунчук' – 96,6% (MS № 1), 95,0% (MS № 2), 89,8% (MS № 3), найповільніше – спельти сорту 'Зоря України' – 64,2% (MS № 1), 59,8% (MS № 2), 47,2% (MS

№ 3). Зразки спельти ‘Альберта’ та пшениці м’якої ‘Елегія Миронівська’ відзначились помірною швидкістю утворення калюсів, а саме 74,4% (MS № 1), 75,0% (MS № 2), 65,2% (MS № 3) – спельти ‘Альберта’, та 76,6% (MS № 1), 90,2% (MS № 2), 85,0% (MS № 3) – пшениці м’якої ‘Елегія Миронівська’.

Окрім калюсоутворення, подекуди спостерігали індукований органогенез. Деякі зразки, зокрема спельти ‘Альберта’ та ‘Зоря України’, (рис. 1, 3) на різних типах живильних середовищ, починаючи з 6–7 доби культивування, утворювали світло-жовті пагони, які до 21 доби сягали 45 мм. Варто зауважити, що експланти, з яких проростали пагони, продовжували утворювати калюси. Кількість експлантів, з яких формувались пагони, була менше 10%.

Отримані результати дослідження ефективності калюсогенезу спельти є першим етапом для розробки методики введення в культуру *in vitro* зразків спельти, створення ефективної системи їхньої регенерації та подальшого отримання біотехнологічних рослин (генетично-модифіковані рослини, рослини з редагованим геномом тощо).

Висновки

Отримано культуру тканин *in vitro* для 3 зразків спельти та 2 зразків пшениці м’якої з використанням в якості експлантів зрілих зародків. Встановлено, що найефективнішим для калюсоутворення із експлантів зрілих зародків спельти та пшениці м’якої було живильне середовище MS, доповнене 2 мг/л 2,4-Д, 10 мл/л аргентуму нітрату та 3% сахарози, ефективність калюсогенезу різних зразків на якому на 21 добу становила 80,2–100,0%.

Показано, що досліджувані зразки відрізнялись між собою за здатністю формувати калюси із зрілих зародків на живильних середовищах із різним компонентним складом. Деякі зразки показали генетичну схильність до калюсоутворення із зрілих зародків незалежно від модифікованого складу середовища MS, зокрема спельта сорту ‘Європа’ та пшениця м’яка сортів ‘Бунчук’ та ‘Елегія Миронівська’, у той час як на експлантах спельти сорту ‘Зоря України’ спостерігали повільне формування калюсу.

Найефективнішим калюсоутворення було у зразку спельти сорту ‘Європа’, значення якого на 7 добу коливалось в межах 91,0–95,0%.

Подяки

Висловлюємо щирі подяки НАН України, яка надала фінансову підтримку цього до-

слідження згідно з відомчою тематикою (№ держреєстрації U01174002589).

Використана література

- Kumar A., Priya, Sharma S., Yadav M. K. Plant tissue culture technology to Improve crop species – a comprehensive approach. *Acta Sci. Agric.* 2019. Vol. 3, Iss. 2. P. 76–80.
- Sticklen B. M., Oraby F. H. Invited review: shoot apical meristem: a sustainable explant for genetic transformation of cereal crops. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2005. Vol. 41, Iss. 3. P. 187–200. doi: 10.1079/IVP2004616
- Ahloowalia B. S. Plant regeneration from callus culture in wheat. *Crop Sci.* 1982. Vol. 22, Iss. 2. P. 405–410. doi: 10.2135/cropsci1982.0011183X002200020047x
- Nasircilar G. A., Turgut K., Fiskin K. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of different wheat genotypes. *Pak. J. Bot.* 2006. Vol. 38, Iss. 3. P. 637–635.
- McHughen A. Rapid regeneration of wheat *in vitro*. *Ann. Bot.* 1983. Vol. 51, Iss. 6. P. 851–853. doi: 10.1093/oxfordjournals.aob.a086535
- Al-Kaaby H. K., Abdul-Qadir L. H., Kareem M. A. Effect of silver nitrate on callus induction, somatic embryos formation and plantlets regeneration in two local wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Thi-Qar Univ. J. Agric. Res.* 2015. Vol. 4, Iss. 2. P. 51–60.
- Mahmood I., Razzaq A., Qureshi A. A. et al. Comparative morpho-physiological response of *in vitro* selected somaclones of wheat (*Triticum aestivum* L.) and explant donor parent to drought stress. *J. Natn. Sci. Foundation Sri Lanka.* 2018. Vol. 46, Iss. 3. P. 293–302 doi: 10.4038/jnsfr.v46i3.8481
- Kopertekh L. G., Stribnaya L. A. Plant regeneration from wheat leaf explants. *Russ. J. Plant Physiol.* 2003. Vol. 50, Iss. 3. P. 365–368. doi: 10.1023/A:1023826304989
- Konieczny R., Czaplicki A. Z., Golczyk H., Przywara L. Two pathways of plant regeneration in wheat anther culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2003. Vol. 73, Iss. 2. P. 177–187. doi: 10.1023/A:1022877807237
- Symillides Y., Henry Y., De Buyser J. Analysis of Chinese Spring regenerants obtained from short- and long-term wheat somatic embryogenesis. *Euphytica.* 1995. Vol. 82, Iss. 3. P. 263–268. doi: 10.1007/BF00029569
- Bommineni V. R., Jauhar P. P. Regeneration of plantlets through isolated scutellum culture of durum wheat. *Plant Sci.* 1996. Vol. 116, Iss. 2. P. 197–203. doi: 10.1016/0168-9452(96)84541-9
- Przetakiewicz A., Nadolska-Orczyk A. The effect of auxin on plant regeneration of wheat, barley and *Triticale*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2003. Vol. 73, Iss. 3. P. 245–256. doi: 10.1023/A:1023030511800
- Ihsan S. M., Jabeen M., Ilahi I. *In vitro* callus induction, its proliferation and regeneration in seed explants of wheat (*Triticum aestivum* L.) Var.lu-26s. *Pak. J. Bot.* 2003. Vol. 35, Iss. 2. P. 209–217.
- Haliloglu K. Wheat immature embryo culture for embryogenic callus induction. *J. Biol. Sci.* 2002. Vol. 2, Iss. 8. P. 520–521. doi: 10.3923/jbs.2002.520.521
- Baday S. J. S. *In vitro* study of the callus induction of two varieties of wheat seeds by plant growth regulators. *Agric. J.* 2018. Vol. 13, Iss. 3. P. 67–71. doi: 10.3923/aj.2018.67.71
- Fernandez S., Michaux-Ferriere N., Coumans M. The embryogenic response of immature embryo cultures of durum wheat (*Triticum durum* Desf.): histology and improvement by AgNO₃. *Plant Growth Regul.* 1999. Vol. 28, Iss. 3. P. 147–155. doi: 10.1023/A:1006142504577
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Phys. Plant.* 1962. Vol. 15, Iss. 3. P. 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *J. Exp. Cell*

- Res. 1968. Vol. 50, Iss. 1. P. 151–158. doi: 10.1016/0014-4827(68)90403-5
19. Gouranga U., Moutushi S., Amitava R. *In vitro* callus induction and plant regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) var. 'Sita', 'Rupali' and 'Swarna Masuri'. *Asian J. Plant Sci. Res.* 2015. Vol. 5, Iss. 5. P. 24–27.
 20. Abd El-Fatah B. E. S. Genetic studies of response to mature embryo culture and relationship with agro-morphological traits and molecular markers in wheat. *Plant Breed. Biotech.* 2018. Vol. 6, Iss. 3. P. 267–284. doi: 10.9787/PBB.2018.6.3.267
 21. Parmar S. S., Sainger M., Chaudhary D., Jaiwal P. K. Plant regeneration from mature embryo of commercial Indian bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 2012. Vol. 18, Iss. 2. P. 177–183. doi: 10.1007/s12298-012-0101-2
 22. Wu L. M., Wei Y. M., Zheng Y. L. Effects of silver nitrate on the tissue culture of immature wheat embryos. *Russ. J. Plant Physiol.* 2006. Vol. 53, Iss. 4. P. 530–534. doi: 10.1134/S1021443706040157
- ## References
1. Kumar, A., Priya, Sharma, S., & Yadav, M. K. (2019). Plant tissue culture technology to improve crop species – a comprehensive approach. *Acta Sci. Agric.*, 3(2), 7–80.
 2. Sticklen, B. M., & Oraby, F. H. (2005). Invited review: shoot apical meristem: a sustainable explant for genetic transformation of cereal crops. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.*, 41(3), 187–200. doi: 10.1079/IVP2004616
 3. Ahloowalia, B. S. (1982). Plant regeneration from callus culture in wheat. *Crop Sci.*, 22(2), 405–410. doi: 10.2135/cropsci1982.0011183X002200020047x
 4. Nasircilar, G. A., Turgut, K., & Fiskin, K. (2006). Callus induction and plant regeneration from mature embryos of different wheat genotypes. *Pak. J. Bot.*, 38(3), 637–635.
 5. McHughen, A. (1983). Rapid regeneration of wheat *in vitro*. *Ann. Bot.*, 51(6), 851–853. doi: 10.1093/oxfordjournals.aob.a086535
 6. Al-Kaaby, H. K., Abdul-Qadir, L. H., & Kareem, M. A. (2015). Effect of silver nitrate on callus induction, somatic embryos formation and plantlets regeneration in two local wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Thi-Qar Univ. J. Agric. Res.*, 4(2), 51–60.
 7. Mahmood, I., Razzaq, A., Qureshi, A. A., Qayyum, A., & Qadeer Beig, M. M. (2018). Comparative morpho-physiological response of *in vitro* selected somaclones of wheat (*Triticum aestivum* L.) and explant donor parent to drought stress. *J. Natn. Sci. Foundation Sri Lanka.*, 46(3), 293–302 doi: 10.4038/jnsfsr.v46i3.8481
 8. Kopertekh, L. G., & Stribnaya, L. A. (2003). Plant regeneration from wheat leaf explants. *Russ. J. Plant Physiol.*, 50(3), 365–368. doi: 10.1023/A:1023826304989
 9. Konieczny, R., Czaplicki, A. Z., Golczyk, H., & Przywara, L. (2003). Two pathways of plant regeneration in wheat anther culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 73(2), 177–187. doi: 10.1023/A:1022877807237
 10. Symillides, Y., Henry, Y., & De Buyser, J. (1995). Analysis of Chinese Spring regenerants obtained from short- and long-term wheat somatic embryogenesis. *Euphytica*, 82(3), 263–268. doi: 10.1007/BF00029569
 11. Bommineni, V. R., & Jauhar, P. P. (1996). Regeneration of plantlets through isolated scutellum culture of durum wheat. *J. Plant Sci.*, 116(2), 197–203. doi: 10.1016/0168-9452(96)84541-9
 12. Przetakiewicz, A., & Nadolska-Orczyk, A. (2003). The effect of auxin on plant regeneration of wheat, barley and *Triticale*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 73(3), 245–256. doi: 10.1023/A:1023030511800
 13. Ihsan, S. M., Jabeen, M., & Ilahi, I. (2003). *In vitro* callus induction, its proliferation and regeneration in seed explants of wheat (*Triticum aestivum* L.) Var.lu-26s. *Pak. J. Bot.*, 35(2), 209–217.
 14. Haliloglu, K. (2002). Wheat immature embryo culture for embryogenic callus induction. *J. Biol. Sci.*, 2(8), 520–521. doi: 10.3923/jbs.2002.520.521
 15. Baday, S. J. S. (2018). *In vitro* study of the callus induction of two varieties of wheat seeds by plant growth regulators. *Agric. J.*, 13(3), 67–71. doi: 10.3923/aj.2018.67.71
 16. Fernandez, S., Michaux-Ferriere, N., & Coumans, M. (1999). The embryogenic response of immature embryo cultures of durum wheat (*Triticum durum* Desf.): histology and improvement by AgNO₃. *J. Plant Growth Regul.*, 28(3), 147–155. doi: 10.1023/A:1006142504577
 17. Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Phys. Plant.*, 15(3), 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
 18. Gamborg, O. L., Miller, R. A., & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *J. Exp. Cell Res.*, 50(1), 151–158. doi: 10.1016/0014-4827(68)90403-5
 19. Gouranga U., Moutushi S., & Amitava R. (2015). *In vitro* callus induction and plant regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) var. 'Sita', 'Rupali' and 'Swarna Masuri'. *Asian J. Plant Sci. Res.*, 5(5), 24–27.
 20. Abd El-Fatah, B. E. S. (2018). Genetic studies of response to mature embryo culture and relationship with agro-morphological traits and molecular markers in wheat. *Plant Breed. Biotech.*, 6(3), 267–284. doi: 10.9787/PBB.2018.6.3.267
 21. Parmar, S. S., Sainger, M., Chaudhary, D., & Jaiwal, P. K. (2012). Plant regeneration from mature embryo of commercial Indian bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Physiol. Mol. Biol. Plants.*, 18(2), 177–183. doi: 10.1007/s12298-012-0101-2
 22. Wu, L. M., Wei, Y. M., & Zheng, Y. L. (2006). Effects of silver nitrate on the tissue culture of immature wheat embryos. *Russ. J. Plant Physiol.*, 53(4), 530–534. doi: 10.1134/S1021443706040157

УДК 602.7:57.085.2:633.11

Кириенко А. В.^{1,2*}, Парий М. Ф.², Кучук М. В.¹, Симоненко Ю. В.^{1,2}, Щербак Н. Л.¹ Разработка эффективной методики индукции калюсогенеза из зрелых зародышей *Triticum spelta* L. и *T. aestivum* L. // *Plant Varieties Studying and Protection*. 2019. Т. 15, № 3. С. 259–266. <https://doi.org/10.21498/2518-1017.15.3.2019.181084>

¹Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, ул. Академика Заболотного, 148б, г. Киев, 03143, Украина, *e-mail: anastasija.kirienko@gmail.com

²Всеукраинский научный институт селекции, ул. Васильковская, 30, г. Киев, 03022, Украина

Цель. Введение в культуру *in vitro* и получение калюса от зрелых зародышей 3 образцов спелты и сравнение эффективности их калюсогенеза с 2 образцами пшеницы мягкой. **Методы.** Для работы взяты 5 образцов гексаплоидной пшеницы – 3 спелты и 2 пшеницы мягкой. Поверхностную стерилизацию зерна проводили в 96% этиловом спирте и 5% растворе гипохлорита натрия. В качестве эксплантов использовались зрелые зародыши.

Для калюсогенеза использовали три типа питательных сред MS с различным компонентным составом. Экспланты культивировали в темноте 21 день. **Результаты.** Подобраны оптимальные условия для индукции культуры тканей *Triticum spelta* L. и *T. aestivum* L. из зрелых зародышей. Полученные калюсы из разных образцов, которые выращивали на трех типах питательных сред MS, не отличались между собой морфологически. Наблюдала генетическую

предрасположенность к каллюсообразованию образцов спельты сорта 'Європа' и пшеницы мягкой сортов 'Бунчук' и 'Елегія Миронівська' независимо от состава среды MS в то время, как на эксплантах спельты сорта 'Зоря України' происходило медленное формирование каллюса. **Выводы.** Получено культуру тканей 3 образцов спельты и 2 образцов пшеницы мягкой с использованием в качестве эксплантов зрелых зародышей. Установлено, что наиболее эффективной для каллюсообразования из эксплантов зрелых зародышей пшеницы мягкой и спельты была пита-

тельная среда, дополненная 2 мг/л 2,4-Д, 10 мл/л нитрата серебра и содержащая 3% сахарозы. Среднее значение эффективности каллюсогенеза при этом составляло 80,2–100,0% на 21 сутки выращивания. Исследуемые образцы отличались между собой способностью формировать каллюс на питательных средах с различным компонентным составом. Впервые в Украине исследована эффективность каллюсогенеза спельты.

Ключевые слова: спельта; пшеница мягкая; культура *in vitro*; каллюс; экспланты.

UDC 602.7:57.085.2:633.11

Kyriienko, A. V.^{1,2*}, Parii, M. F.², Kuchuk, M. V.¹, Symonenko, Yu. V.^{1,2}, & Shcherbak, N. L.¹ (2019). Elaboration of an effective method of callusogenesis induction from mature germs of *Triticum spelta* L. and *T. aestivum* L. *Plant Varieties Studying and Protection*, 15(3), 259–266. <https://doi.org/10.21498/2518-1017.15.3.2019.181084>

¹Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, NAS of Ukraine, 148 Akademika Zabolotnoho St., Kyiv, 03143, Ukraine,

*e-mail: anastasija.kirienko@gmail.com

²Ukrainian Scientific Institute of Plant Breeding, 30 Vasylykivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

Purpose. Introduction to *in vitro* culture and obtaining of callus from mature embryos of 3 spelt samples and comparing the effectiveness of their callusogenesis with 2 soft wheat samples. **Methods.** Five samples of hexaploid wheat (three of spelt and two of soft wheat) were taken for experiments. Surface sterilization of grains was carried out in 96% ethanol and 5% sodium hypochlorite solution. Mature embryos were used as explants. Three types of MS culture media with different component compositions were used for callusogenesis. Explants were cultivated in the dark for 21 days. **Results.** The optimal conditions for the induction of tissue culture of *Triticum spelta* L. and *T. aestivum* L. from mature embryos were selected. Received calli from different samples, which were grown on three types of culture media MS, did not differ morphologically from each other. A genetic predisposition to callus formation was observed for specimens of 'Європа' spelt variety and soft wheat 'Bunchuk'

and 'Elehiia Myronivska' wheat samples regardless of the composition of the MS medium, while callus formation was slow on the explants of 'Zoria Ukrainy' cultivar. **Conclusions.** A tissue culture of 3 spelt samples and 2 soft wheat samples was obtained using mature embryos as explants. It was found that a nutrient medium containing 3% sucrose and supplemented with 2 mg/L 2,4-D, 10 ml/L silver nitrate was the most effective for callus formation from mature germ explants of soft wheat and spelt. The efficiency of the callusogenesis on the 21st day of cultivation, depending on the sample, varied in the range of 80.2–100.0%. The studied samples differed among themselves in their ability to form calli on nutrient media with different component composition. The efficiency of spelt callusogenesis was first studied in Ukraine.

Keywords: spelt; soft wheat; *in vitro* culture; callus; explants.

Надійшла / Received 27.08.2019
Погоджено до друку / Accepted 19.09.2019